

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-50931

(P2001-50931A)

(43) 公開日 平成13年2月23日 (2001.2.23)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 27/416		G 0 1 N 27/46	3 3 6 Z 2 G 0 4 5
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09		G 0 1 N 33/483	F 4 B 0 2 9
G 0 1 N 27/327		C 1 2 N 15/00	A
// G 0 1 N 33/483		G 0 1 N 27/30	3 5 1
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 8 頁)			

(21) 出願番号 特願平11-224681

(22) 出願日 平成11年8月6日 (1999.8.6)

(71) 出願人 594079615

宮原 孝俊

千葉県千葉市美浜区高浜6丁目19-15

(71) 出願人 399045949

内田 和彦

茨城県つくば市松代5-16-527-201

(71) 出願人 399045950

竹中 繁純

福岡県古賀市舞の里4-23-21

(72) 発明者 内田 和彦

茨城県つくば市松代5-16-527-201

(74) 代理人 100110179

弁理士 光田 敦

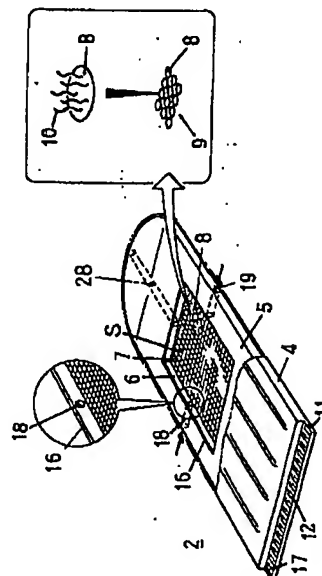
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子の一塩基置換 SNP と点突然変異を検出する方法、並びに検出装置及び検出チップ

(57) 【要約】

【課題】 複数のサンプル DNA を対象に、大量の一塩基置換 SNP と点突然変異を高感度に検出、解析を可能とする。

【解決手段】 密閉空間部 S の底面 7 に多数の金電極 8 が形成され、この金電極 8 には異なる遺伝子配列から成るオリゴヌクレオチド 10 が固定されており、この金電極 8 と接触しないように共通電極 16 が配置されて成る遺伝子の一塩基置換 SNP と点突然変異の検出用チップ 2 内の空間部 S にサンプル DNA を充填し、共通電極 16 と金電極 8 間に電圧を印加し、電流を検出してハイブリリタイゼーションした二鎖 DNA を検出し、解析可能とする。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプルDNAを充填及び除去可能とする密閉された内部空間部と、
該空間部の底面に形成された測定極である多数の金電極と、

上記空間部において上記金電極と接触しないように配置された対極である共通電極とを備えた、遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出用チップであって、
上記金電極には、異なる遺伝子配列から成るPCR産物もしくはオリゴヌクレオチドが固定されており、
上記共通電極と上記金電極間に電圧が印加され、電流が検出されることが可能であることを特徴とする遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出用チップ。

【請求項2】 サンプルDNAを充填及び除去可能とする密閉された内部空間部と、
該空間部の底面に形成された測定極である多数の金電極と、

上記空間部において上記金電極と接触しないように配置された対極である共通電極と、

上記共通電極と上記金電極間に電圧を印加し電流を検出可能とする測定装置とを備えた遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出装置であって、

上記金電極には、異なる遺伝子配列から成るPCR産物もしくはオリゴヌクレオチドが固定されていることを特徴とすることを特徴とする遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出装置。

【請求項3】 上記内部空間、上記金電極及び上記共通電極を検出チップ内に含まれるように形成し、上記検出チップを、上記検出測定装置に着脱自在に装着し電気的に接続できるように構成されていることを特徴とする請求項2記載の遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出装置。

【請求項4】 上記検出チップの温度をペルチエ素子を用いて変化させ、上記ハイブリダイゼーションの温度条件をコントロール可能としたことを特徴とする請求項2又は3記載の遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出装置。

【請求項5】 請求項2、3又は4記載の空間部内に、サンプルDNA又はサンプルDNAから遺伝子増幅されたDNAを充填し、ハイブリダイゼーションを行わせて二本鎖を形成し、

その後、上記空間部内に、電気化学活性分子を含む電解質を充填して、温度をコントロールして上記二本鎖に電気化学活性分子を結合させ、

そして、上記共通電極と上記金電極間に電圧を印加して流れる電流値を検出することにより、サンプルDNAの一塩基置換SNPと点突然変異を検出することを特徴とする遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子の発現など、遺伝子DNAの一塩基置換SNP（シングル・ヌクレオチド・ポリモフィズム：人の遺伝コード中の変種）と点突然変異を検出し解析可能とする遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異を検出する方法、並びに検出装置及び検出チップ装置に関する。

【0002】

【従来の技術】一塩基置換SNPとは、ヒトDNAの1000bpから2000bpに1つあると言われている塩基配列の一塩基変化であり、正常人、病気の人問わず人には数十万から数百万のSNPがあると考えられており、病因の解明、予防に有効なマーカーと期待されている。

【0003】点突然変異とは、すでに既知である遺伝子における塩基配列の一塩基の変化であり、これにより翻訳されるタンパク質の機能異常がみられ、疾患の原因になる場合がある。

【0004】遺伝子DNAの塩基配列の違いを検出、解析する手段としては、DNAシーケンス法（塩基配列決定法）、PCR-SSCP（Polymerase chain reaction-single stranded polymorphism）法、アレル特異的ハイブリダイゼーション法、DNAチップ法等が用いられている。

【0005】DNAシーケンス法は、マキサム・ギルバート法とサンガー（ダイデオキシ）法があるが、現在は主にダイデオキシ法が用いられている。ヒトの遺伝子の解析したい領域をPCR法（ポリミラーゼ連鎖反応法）で増幅したのち、PCR法で用いたプライマー若しくは増幅DNA内に設定したプライマーを用いてシーケンスを行い、当領域内の遺伝子配列を決定する。この操作を異なるサンプルDNAを用いて行うことで、遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異を検出する。

【0006】PCR-SSCP（Polymerase chain reaction-single stranded polymorphism）法はヒトの遺伝子の解析したい領域をPCR法で増幅した後、熱変性で一本鎖にし、これを非変性ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動を行うことで、PCR法で増幅した2本鎖DNAのそれぞれの鎖に2次構造（分子内水素結合）を形成させる。一塩基配列の違いによって2次構造（分子内水素結合）がことなるため、電気泳動距離の違いによって遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異を検出する。

【0007】アレル特異的ハイブリダイゼーション法では、解析したい領域をPCR法で増幅した後、メンブレン（ナイロンフィルター）の領域内に20塩基程度のPCR産物もしくはオリゴヌクレオチドプローブを作成し、そこに放射性同位元素³²Pなどで標識したサンプルDNA（被検出DNA）をハイブリダイゼーションさせるものである。その際の温度等のハイブリダイゼーシ

ョン条件を調節することで、遺伝子の一塩基性SNPと点突然変異を放射性同位元素の強度の差で検出する。

【0008】DNAチップ法は、原理的にはアレル特異的ハイブリダイゼーション法とほぼ同じであるが、20塩基程度のPCR産物もしくはオリゴヌクレオチドプローブを固定相（基盤上）に並べ、そこに蛍光標識したサンプルDNA（被検出DNA）をハイブリダイゼーションさせるものである。温度等のハイブリダイゼーション条件を調節することで、ヒトの遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異を蛍光強度の差によって検出するものである。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】アレル特異的ハイブリダイゼーション法におけるハイブリダイゼーションの場合は、DNAを放射性同位元素で標識するために、放射性同位元素の取り扱いと管理に多大な費用が有することが問題である。又、DNAチップ法の場合は、蛍光色素で標識すると、蛍光色素の大きな分子構造のために十分な頻度で蛍光がDNAにとりこまれないために、蛍光標識プローブの蛍光強度が高くないこと、さらに蛍光の退色及びガラス等の基盤の有する蛍光（背景部分の蛍光）が問題になる。

【0010】このような問題点を解決するために、簡単に感度の優れたDNAハイブリッド形成の検出、二本鎖DNAを検出する方法として、プローブDNAを電極に固定し、このプローブDNAを、インターカレータ存在下においてサンプルDNAと反応させて、二本鎖DNAの検出、ハイブリッド形成体の検出を電気化学的に行う方法が開示されている（特開平9-288080号公報及び第57回分析化学討論会予稿集、P137-138、1996年、参照）。

【0011】しかしながら、遺伝子の一塩基置換SNPや遺伝子の突然変異の数は莫大であり、例えばヒトの場合15KBの密度（解像度）の一塩基置換SNP地図を作成するためには、すくなくとも200万の一塩基置換SNPを同定しなければならない。又、既知の疾患に関係する遺伝子の点突然変異の数もきわめて多い。一塩基置換や点突然変異を網羅的に解析することは従来の方法では現実的に不可能に近い。

【0012】本発明は、上記従来の問題点を解決することを目的とするものであり、複数のサンプルDNAを対象に、大量の一塩基置換SNPと点突然変異を検出、解析することが可能な、すなわちハイスループット（高速大量）の処理ができ、しかも高感度に検出と解析が可能な一塩基置換SNPと点突然変異の同定装置を提供する。要するに、本発明は、特開平9-288080号公報に記載された二本鎖DNAの検出、ハイブリッド形成体の検出を電気化学的に行う原理に基づいて、大量かつ高感度で一塩基置換SNPと点突然変異の検出・解析装置として実現しようとするものである。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記課題を解決するために、サンプルDNAを充填及び除去可能とする密閉された内部空間部と、該空間部の底面に形成された測定極である多数の金電極と、上記空間部において上記金電極と接触しないように配置された対極である共通電極とを備えた、遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出用チップであって、上記金電極には、異なる遺伝子配列から成るPCR産物もしくはオリゴヌクレオチドが固定されており、上記共通電極と上記金電極間に電圧が印加され、電流が検出されることが可能であることを特徴とする遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出用チップを提供する。

【0014】さらに、本発明は、上記課題を解決するために、サンプルDNAを充填及び除去可能とする密閉された内部空間部と、該空間部の底面に形成された多数の金電極と、上記空間部において上記金電極と接触しないように配置された共通電極と、上記共通電極と上記金電極間に電圧を印加し電流を検出可能とする測定装置とを備えた遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出装置であって、上記金電極には、異なる遺伝子配列から成るPCR産物もしくはオリゴヌクレオチドが固定されていることを特徴とすることを特徴とする遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出装置を提供する。

【0015】上記内部空間、上記金電極及び上記共通電極を検出チップ内に含まれるように形成し、上記検出チップを、上記検出測定装置に着脱自在に装着し電気的に接続できるような構成としてもよい。

【0016】上記検出チップの温度をペルチエ素子を用いて変化させ、上記ハイブリダイゼーションの温度条件をコントロール可能としてもよい。

【0017】さらに、本発明は、上記課題を解決するために、空間部内に、サンプルDNA又はサンプルDNAから遺伝子増幅されたDNAを充填し、パイブリダイゼーションを行わせて二本鎖鎖を形成し、その後、上記空間部内に、電気化学活性分子を含む電解質を充填して、温度をコントロールして上記二本鎖に電気化学活性分子を結合させ、そして、上記共通電極と上記金電極間に電圧を印加して流れる電流値を検出することにより、サンプルDNAの一塩基置換SNPと点突然変異を検出することを特徴とする遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出方法を提供する。

【0018】

【発明の実施の形態】本発明に係る遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出方法、並びに検出装置及び検出チップの実施の形態を実施例に基づいて図面を参照して、以下説明する。図1において、本発明に係る遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出装置1は、ハイブリダイゼーション用の検出チップ2と、この検出チップ2を差し込んで、ハイブリダイゼーションにより生じ

る二本鎖DNAを検出し解析可能とする測定装置3とから構成される。

【0019】図2において、検出チップ2は、セラミックスや合成樹脂材等により、カードあるいはカセット状のチップとして形成されており、本体部4と、該本体部4に上方から装着される上部カバー5（図中想像線で示される）とから構成される。この検出チップ2は、酸及びアルカリに耐性を有する材料で形成されており、特に、上部カバー5はする外部から観察できるように透明であることが好ましい。

【0020】本体部4のほぼ中央には、矩形の窪み6が形成されている。これにより、本体部4に上部カバー5を装着して一体とすると、その窪みの部分が、密閉された空間部Sとなる。空間部Sの底面、即ち、窪み6の底面7には、金のスポットをマトリックス状に配列して蒸着し、多数の金電極8から構成されるアレー状金電極9が形成されている。

【0021】図2の右側に金電極8の拡大図を示しているが、この拡大図で示されているように、金電極8上には、PCR産物、オリゴヌクレオチドの5'末端にチオール化してSH基を導入したSH化オリゴヌクレオチド10が固定されている。PCR産物は二本鎖DNAであるが、一方の鎖の5'末端をチオール化し、SH基を導入してあるこのオリゴヌクレオチドは、20～50塩基含む長さを有し、その基端に導入したチオール基を介して金電極8上に固定されている。

【0022】検出チップ2の先端部11には、多数のターミナル端子12が並設されている。金電極8は、夫々配線13に結合され、該配線の他端は、ターミナル端子12の夫々と結合するように伸設されている。

【0023】なお、図4(a)に示すように、金電極9に対する配線は、金電極8それぞれに対応して一本ずつ接続してそれぞれターミナル端子12に接続してもよいが、図4(b)に示すように、液晶表示装置等に利用されている、多数の縦及び横の導線14、15から成る格子状の配線として、アレー状に配置した金電極9を夫々近接する縦及び横の導線に接続するマトリックス配線構造とする。この場合、縦及び横の導線の一端がターミナル端子12に接続されることとなる。

【0024】本実施例では、窪み6の底面でマトリックス状に配列してある金電極9と接しない位置に対極である共通電極16が配列されている。共通電極16の配線は金電極同様に金の蒸着によって形成される。共通電極16は、共通電極用ターミナル端子17に接続されるように伸設されている。さらに、それぞれの金電極9と対極である共通電極16の間の電流値は、窪み6内の空間に接する形で配線された参照電極28の値を基準に測定され、測定ごとに正確な電流値が得られる構造となっている。

【0025】検出チップ2の本体部4の及び上部カバー

5の両側部に、窪み6に連通する左右の注入孔18、19（図2中の上方に示された要部拡大図参照。）が形成されており、通常はキャップ栓により閉鎖されており、密閉空間Sを形成している。キャップをはずし、この注入孔18、19にディスポーザルの注射器20、21を挿入できる。これにより、窪み6と上部カバー5により画成される密封された空間部S内へ溶液を注入したり、あるいは空間部S内の溶液の交換や混合を迅速に行うことができる。

10 【0026】測定装置3は、検出チップ2を差し込む挿入口22を有している。挿入口22の内部には、図4(c)で示すように、共通電極用ターミナル端子17及び各金電極用ターミナル端子12に接続して、共通電極用ターミナル端子17及び各金電極用ターミナル端子12間に電圧を印加する回路23が配設されている。そして、共通電極用ターミナル端子17と各金電極用ターミナル端子12間に電圧が印加された際に、共通電極16と各金電極8の間に流れる電流を、回路23に設けられた検出器24で検出して測定できるように構成とされている。

20 【0027】この検出した電流に基づく測定データは、検出器24に接続するA-D変換器25等でデジタル化され、パソコン26によりサンプルの解析、同定等の処理データとして利用される。さらに、測定装置3には、ペルチェ素子から成る温度コントロール装置が装備されている。

30 【0028】以上のような構成から成る本発明に係る遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出装置1の作用について説明する。検出チップ2は、本体部4に上部カバーが一体に結合され密閉されている。そして、図3に示すように、注入孔18、19に注射器20、21を挿入してサンプルDNAを含む溶液を注入する。

【0029】なお、サンプルDNAは、生物材料から抽出したDNAを、DNA分解酵素もしくは超音波処理で分解したもの、又は特定の遺伝子からPCR（ポリメラーゼ連鎖反応法）によって増幅したDNAを用いる。これらのサンプルDNAは、ハイブリダイゼーションの直前に熱処理によって変性しておく。

【0030】固定されたPCR産物もしくはオリゴヌクレオチドのDNA（一本鎖の状態）にサンプルDNA（一本鎖の状態）が添加されると、互いに相補的な塩基配列を持つPCR産物もしくはオリゴヌクレオチドのDNAとサンプルDNAは、ハイブリダイゼーションが行われる。この際、検出チップ2を測定装置3内の挿入口22に挿入して装着し、測定装置3内に装備されたペルチェ素子により、温度をコントロールし、ハイブリダイゼーションの温度条件にコントロールする。

【0031】このハイブリダイゼーションが行われた後、検出チップ2を測定装置3から抜いて、一方の注入孔18から注射器で洗浄液を注入し、他方の注入孔19

から空間部S内の液を吸引して、ハイブリダイゼーションしなかったサンプルDNAを洗い流して洗浄する。

【0032】このような洗浄を行った後に、電気化学活性分子を含む電解質溶液を注射器により注入孔18、19から空間部S内に注入する。電気化学活性分子は、ハイブリダイゼーションにより二本鎖DNAの抵抗値等の電気的特性を変化させる機能を奏する。この点については、特開平9-288080号公報に詳細に説明されている。

【0033】このような処理を行った検出チップ2を測定装置3に再度装着し、検出チップ2の共通電極用ターミナル端子17及び各金電極用ターミナル端子12を電圧回路23に接続し、共通電極16と各金電極8の間に弱い電圧をかけると、ハイブリダイゼーションにより生じた二本鎖DNAと接続された金電極8には、電圧回路23及び共通電極16を通して微弱電流が流れる。測定装置3内に装備されたペルチエ素子により温度をコントロールし、異なる温度での電流値を測定する。

【0034】測定装置3では、図4(c)に示すように、各金電極用端子12に対して走査端子27が自動的に切り替えられることにより、順次ハイブリダイゼーションの後の二本鎖DNAに電流が流れて検出され、この検出結果が、A-D変換器等によりデジタルデータに変換されて、パソコンで測定データとしてメモリ等に蓄積される。この測定データにより、サンプルDNAの同定や解析が行われる。例えば、予め蓄積されている各種類のDNAデータ等と比較することにより、サンプルDNAの解析や同定が可能となる。

【0035】次に本発明に係わる遺伝子の塩基置換、点突然変異等の電気化学的検出装置の実験例を説明する。

【0036】(実験例1) 遺伝子p53の72番目のコドンにおける一塩基置換SNPの検出の実験例を示す。以下の2種類のポリモルフィズム(遺伝的多型)に相当する塩基配列をもつオリゴヌクレオチドを金電極それぞれにスポットすることにより固定化した。

p53Pro(コドン72番目がPro)

p53Arg(コドン72番目がArg)

【0037】これにp53のコドン72番目がProであるの正常人の末梢血から採取したDNA、及びこのDNAからp53の*

*エキソン4に存在するコドン72を含む領域を増幅したPCR産物を熱変性後ハイブリダイゼーション反応を行った。測定電解質溶液として0.1M AcOH-AcOK (pH5.6)、0.1M KCl、0.05mM NfC中で20度で470 mV (Ag/AgCl参照電極基準)のハイブリダイゼーション前後の電流値変化を測定した。

末梢血から採取したDNA

p53Proの電流変化(%) 52%

p53Argの電流変化(%) 15%

PCR産物

p53Proの電流変化(%) 65%

p53Argの電流変化(%) 13%

【0038】さらにp53のコドン72番目がArgである正常人の末梢血から採取したDNA、及びこのDNAからp53のエキソン4に存在するコドン72を含む領域を増幅したPCR産物を同様にハイブリダイゼーション反応を行った。

末梢血から採取したDNA

p53Proの電流変化(%) 46%

p53Argの電流変化(%) 17%

PCR産物

p53Proの電流変化(%) 53%

p53Argの電流変化(%) 11%

【0039】これらの電流変化は、完全にマッチした塩基配列の場合とミスマッチの場合では明らかな差が認められた。

【0040】(実験例2) 塩基置換の数によって測定する電流値が異なり、これによりミスマッチの量が測定できることを示した実験例を説明する。dT20、dT10dAdT9、dT8dA4dT8、dAdT19、dA3dT17、dT19dA、dT17dA3の7種のオリゴヌクレオチドを金電極それぞれにスポットすることにより固定化した。これにdA20をハイブリダイゼーション反応を行った。

【0041】測定電解質溶液として0.1M AcOH-AcOK (pH5.6)、0.1M KCl、0.05mM NfC中、20度で、470 mV (Ag/AgCl参照電極基準)で、ハイブリダイゼーション前後の電流値変化を測定した。この測定結果を表1に示す。

【0042】

【表1】

	dT20	dT10dAdT9	dT8dA4dT8	dAdT19	dA3dT17	dT19dA	dT17dA3
電流変化(%)	37	22	15	14	14	20	12
Tm(度)	46	36	21	45	46	42	41

【0043】表1における電流変化は、ほぼミスマッチ塩基の量に依存した変化であった。特に末端部にミスマッチが存在する場合は、Tm値より大きな変化が見られた。従来のSSCPでは、このような系は検出できなかった

が本手法で初めて明らかとなった。

【0044】以上、本発明に係る遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異を検出する方法、並びに検出装置及び検出チップについて、その実施例で説明したが、本発明

は、特にこのような実施例に限定されることはなく、特許請求の範囲の技術的事項の範囲内で、いろいろな実施の態様があることは言うまでもない。

【0045】

【発明の効果】本発明に係る遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異を検出する方法、並びに検出装置及び検出チップは、以上のような構成であるから、複数のサンプルDNAを対象に、大量の一塩基置換SNPと点突然変異を高感度でもって、検出、解析することが可能になる。

【0046】このように、高感度、ハイスループット（高速大量）の処理ができる本発明に係る検出装置は、生物学、医学分野での遺伝子、表現形質との相関の解析に有効な手段である。薬剤代謝酵素、がん抑制遺伝子などの特定の遺伝子を、本発明に係る一塩基置換SNPと点突然変異の検出・解析装置によって、解析することにより、遺伝子診断の分野にも利用できる。

【0047】例えば、本発明に係る検出装置では、高感度、ハイスループット（高速大量）の処理が可能であるから、日本人の一塩基置換SNPと点突然変異のデータを収集し、病気の発症と関連する一塩基置換SNPと点突然変異を同定し、がん、高血圧などの成人病の予防等に役立てることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る遺伝子の一塩基置換SNPと点突*

* 然変異を検出する検出装置の実施例の全体構成を説明する斜視図である。

【図2】本発明に係る遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異を検出に利用される検出チップの実施例の全体構成を説明する斜視図である。

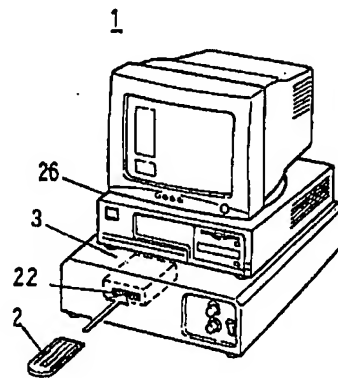
【図3】図2の検出チップの使用状態を説明する斜視図である。

【図4】本発明に係る遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異の検出装置及び検出チップの電極、配線等の構成を説明するための図である。

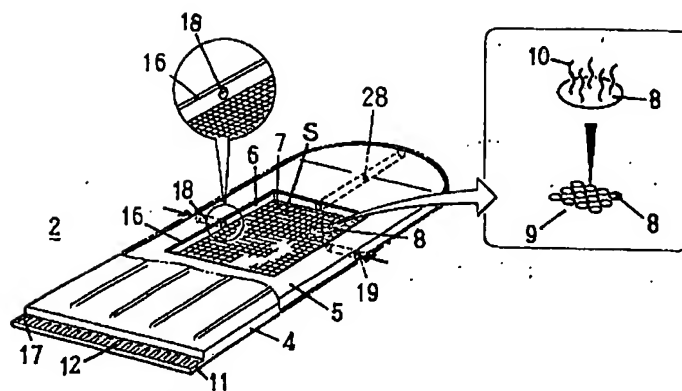
【符号の説明】

- 1 遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異を検出する検出装置
- 2 検出チップ
- 3 測定装置
- 4 窪み
- 8 (各) 金電極
- 9 金電極（群）
- 10 オリゴヌクレオチド
- 12 金電極用ターミナル端子
- 16 共通電極
- 17 共通電極用ターミナル端子
- 18、19 注入孔
- 22 挿入口
- 26 パソコン

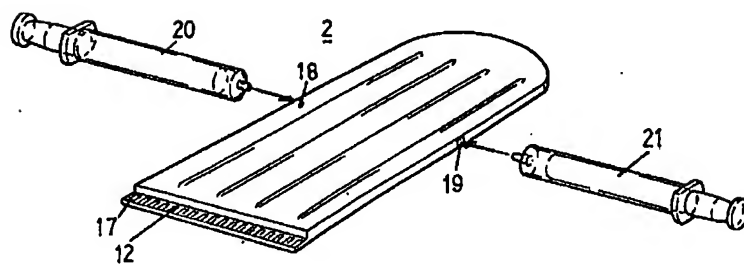
【図1】



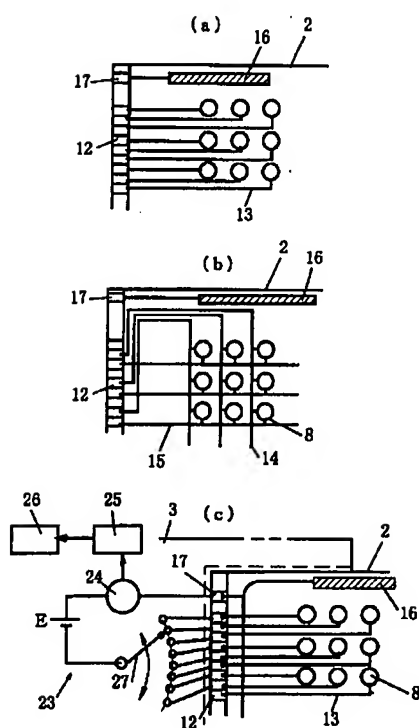
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 竹中 繁織
 福岡県古賀市舞の里4-23-21
 (72)発明者 宮原 孝俊
 千葉県美浜区高浜6-19-15

Fターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA13 BB60 CA25
 CA26 DA13 FA34 FB02 FB05
 GC20 JA01 JA04 JA07
 4B024 AA11 AA20 CA01 HA14 HA19
 4B029 AA23 BB20

(11)Publication number : 2001-050931

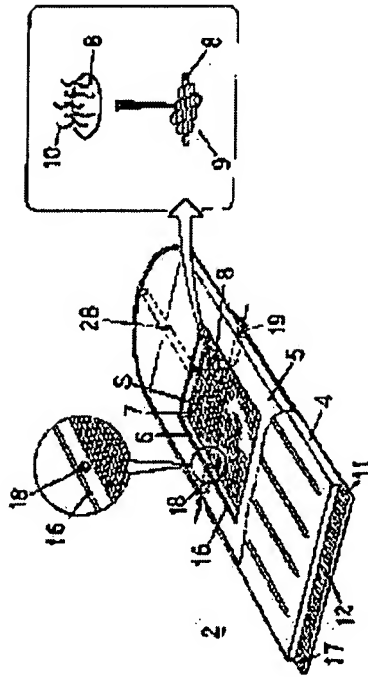
(43)Date of publication of application : 23.02.2001

(51)Int.Cl. G01N 27/416
C12M 1/00
C12N 15/09
G01N 27/327
// G01N 33/483

(21)Application number : 11-224681 (71)Applicant : MIYAHARA
TAKATOSHI
UCHIDA
KAZUHIKO
TAKENAKA
SHIGEORI

(22)Date of filing : 06.08.1999 (72)Inventor : UCHIDA
KAZUHIKO
TAKENAKA
SHIGEORI
MIYAHARA
TAKATOSHI

(54) METHOD AND DEVICE FOR DETECTING ONE BASE SUBSTITUTION SNP
AND POINT MUTATION OF GENE AND DETECTION CHIP



(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To detect and analyze a large quantity of one base substitution SNP and point mutation with high sensitivity with a plurality of sample DNAs as a target.

SOLUTION: A sample DNA is filled into a space part S in a chip 2 for detecting one base substitution SNP and point mutation of a gene, where a number of gold electrodes 8 are formed on a bottom surface 7 of a closed space S and oligonucleotide 10 made of a

different gene arrangement, is fixed to the gold electrode 8, and a common electrode 16 is arranged so that it does not touch the gold electrode 8, a voltage is applied between the common electrode 16 and the gold electrode 8, and a current is detected and a double-chain DNA subjected to hybridization is detected for analysis.

LEGAL STATUS

[[Date of request for examination]] 03.06.2003

[[Date of sending the examiner's decision of rejection]]

[[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]]

[[Date of final disposal for application]]

[[Patent number]] 3888807
[[Date of registration]] 08.12.2006
[[Number of appeal against
examiner's decision of
rejection]]
[[Date of requesting appeal
against examiner's decision of
rejection]]
[[Date of extinction of right]]

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any
damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[[Claim(s)]]

[[Claim 1]] With sealed internal sky Mabe who makes Sample DNA restoration and removable Had the golden electrode of a large number which are the measurement poles formed in the base of this space section, and the common electrode which is a counter electrode arranged so that the above-mentioned golden electrode may not be contacted in the above-mentioned space section. It is the chip for detection of the a little salt radical permutation SNP of a gene, and point mutation. To the above-mentioned golden electrode The chip for detection of the a little salt radical permutation SNP of a gene, and point mutation characterized by a current being able to fix the PCR product or oligonucleotide which consists of a different gene sequence, to impress an electrical potential difference to the above-mentioned common electrode and the above-mentioned golden inter-electrode one, and to be detected.

[[Claim 2]] With sealed internal sky Mabe who makes Sample DNA restoration and removable The golden electrode of a large number which are the measurement poles formed in the base of this space section, and the common electrode which is a counter electrode arranged so that the above-mentioned golden electrode may not be contacted in the above-mentioned space section, It is the detection equipment of the a little salt radical permutation SNP of a gene, and point mutation equipped with the measuring device which impresses an electrical potential difference to the above-mentioned common electrode and the above-mentioned golden inter-electrode one, and makes a current them detectable. To the above-mentioned golden electrode Detection equipment of the a little salt radical permutation SNP of a gene, and point mutation characterized by being characterized by fixing the PCR product or oligonucleotide which consists of a different gene sequence.

[[Claim 3]] Detection equipment of the a little salt radical permutation SNP of a gene according to claim 2, and point mutation characterized by being constituted so that the above-mentioned building envelope, the above-mentioned golden electrode, and the above-mentioned common electrode are formed so that it may be contained in a detection chip, the above-mentioned detection measuring device may be equipped with the above-mentioned detection chip free [attachment and detachment] and it can be connected electrically.

[[Claim 4]] Detection equipment of the a little salt radical permutation SNP of a gene according to claim 2 or 3, and point mutation characterized by having changed the temperature of the above-mentioned detection chip using the Peltier device, and making the temperature conditions of the above-mentioned hybridization controllable.

[[Claim 5]] It is filled up with DNA by which gene amplification was carried out to space circles according to claim 2, 3, or 4 from Sample DNA or Sample DNA. Make hybridization perform, form a double strand chain, and it is filled up with the electrolyte which contains an electrochemistry activated

molecule in the above-mentioned space circles after that. By controlling temperature, combining an electrochemistry activated molecule with the above-mentioned double strand, and detecting the current value which impresses an electrical potential difference to the above-mentioned common electrode and the above-mentioned golden inter-electrode one, and flows The detection approach of the a little salt radical permutation SNP of a gene, and point mutation characterized by detecting the a little salt radical permutation SNP and point mutation of Sample DNA.

[[Translation done.]]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.**** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[[Detailed Description of the Invention]]

[[0001]]

[[Field of the Invention]] This invention relates to detection equipment and detection chip equipment at the approach and list which detect the a little salt radical permutation SNP and point mutation of the gene whose analysis gene expression etc. detects the a little salt radical permutation SNP (single nucleotide poly MOFIZUMU: variety in people's genetic code) and point mutation of Gene DNA, and is enabled.

[[0002]]

[[Description of the Prior Art]] In the a little salt radical

permutation SNP, it is a little salt radical change of the base sequence said to be in one 2000bp(s) from Homo sapiens's DNA 1000bp(s), and it is thought that forward Tsuneto and sick ***** people have millions of [hundreds of thousands to] SNP(s), and the marker effective in the elucidation of a cause of a disease and prevention is expected.

[[0003]] Point mutation is change of the a little salt radical of the base sequence in the gene which is already known, the malfunction of the protein translated by this is seen, and it may become the cause of a disease.

[[0004]] as a means to detect the difference in the base sequence of Gene DNA, and to analyze -- the DNA sequence method (nucleotide sequence) and PCR-SSCP (Polymerase chain reaction-single stranded polymorphism) -- law, the allele specific hybridization method, the DNA chip method, etc. are used.

[[0005]] the DNA sequence method -- Maxam Gilbert -- law and Sanger (die deoxy) -- although there is law, as for current, the dideoxy method is mainly used. After amplifying the field which wants to analyze a human gene by the PCR method (poly MIRAZE chain reaction method), a sequence is performed using the primer set up in the primer used by the PCR method, or Magnification DNA, and the gene sequence in this field is determined. By performing this actuation using a different sample DNA, the a little salt radical permutation SNP and point mutation of a gene are detected.

[[0006]] PCR-SSCP (Polymerase chain reaction-single stranded polymorphism) -- after law amplifies the field which wants to analyze a human gene by the PCR method, it makes it a single strand by thermal denaturation, and makes secondary structure (intramolecular hydrogen bond) form in each chain of the double stranded DNA which is performing electrophoresis in non-denaturalizing polyacrylamide gel, and amplified this by the PCR method the secondary structure (intramolecular hydrogen bond) taken by the difference in a a little salt radical array -- things -- a sake -- electrophoresis distance

-- a difference detects the a little salt radical permutation SNP and point mutation of a gene.

[[0007]] In an allele specific hybridization method, after amplifying a field to analyze by the PCR method, the PCR product or oligonucleotide probe of 20 base extent is created in the field of a membrane (nylon filter), and hybridization of the sample DNA (detection DNA-ed) which carried out the indicator there by radioisotope ^{32}P etc. is carried out. By adjusting hybridization conditions, such as temperature in that case, the difference of the reinforcement of radioisotope detects the a little salt machine nature SNP and point mutation of a gene.

[[0008]] Although the DNA chip method is almost the same as an allele specific hybridization method theoretically, the PCR product or oligonucleotide probe of 20 base extent is arranged in a stationary phase (on a base), and hybridization of the sample DNA (detection DNA-ed) which carried out fluorescent labeling there is carried out. By adjusting hybridization conditions, such as temperature, the difference of fluorescence intensity detects the human a little salt radical permutation SNP and the point mutation of a gene.

[[0009]]

[[Problem(s) to be Solved by the Invention]] In order to carry out the indicator of the DNA with radioisotope in the case of the hybridization in an allele specific hybridization method, it is a problem that great costs have in handling and management of radioisotope. Moreover, if the indicator of the case of a DNA chip method is carried out by the fluorochrome, since fluorescence will not be crowded with frequency sufficient for the big molecular structure of a fluorochrome for DNA, the fluorescence intensity of a fluorescent-labeling probe not being high and the fluorescence (fluorescence for a background) which the base of fading [of fluorescence], glass, etc. has further become a problem.

[[0010]] In order to solve such a trouble, it is easy, fix probe DNA to an electrode as an approach of detect detection of the

DNA hybridization which was excellent in sensibility, and double stranded DNA, this probe DNA is made to react to the bottom of intercalator existence with Sample DNA, and the method of perform electrochemically detection of double stranded DNA and detection of a hybridization object is indicated (JP, 9-288080, A and the collection of the 57th analytical chemistry debate drafts, P137 1996 [-138 or], reference).

[[0011]] However, the number of the mutation of the a little salt radical permutation SNP of a gene or a gene is immense, for example, in order to create a a little salt radical permutation SNP map with a consistency (resolution) of 15KB in the case of Homo sapiens, the a little salt radical permutation SNP of at least 2 million must be identified. Moreover, there is very many point mutation of a gene related to a known disease. It is actually next to impossible by the conventional approach to analyze comprehensively a a little salt radical permutation and point mutation.

[[0012]] This invention can detect and analyze a lot of a little salt radical permutation SNP and point mutation for two or more samples DNA for the purpose of solving the above-mentioned conventional trouble, i.e., processing of a high throughput (high-speed mass) can be performed, and, moreover, it provides high sensitivity with the identification equipment of detection, the a little salt radical permutation SNP in which analysis is possible, and point mutation. In short, based on the principle which performs electrochemically detection of the double stranded DNA indicated by JP, 9-288080, A, and detection of a hybridization object, it is going to realize this invention as detection / analysis equipment of the extensive and high sensitivity a little salt radical permutation SNP and point mutation.

[[0013]]

[[Means for Solving the Problem]] With sealed internal sky Mabe who presupposes that restoration and removal of Sample DNA are possible for this invention in order to solve the

above-mentioned technical problem Had the golden electrode of a large number which are the measurement poles formed in the base of this space section, and the common electrode which is a counter electrode arranged so that the above-mentioned golden electrode may not be contacted in the above-mentioned space section. It is the chip for detection of the a little salt radical permutation SNP of a gene, and point mutation. To the above-mentioned golden electrode The PCR product or oligonucleotide which consists of a different gene sequence is being fixed, an electrical potential difference is impressed to the above-mentioned common electrode and the above-mentioned golden inter-electrode one, and the chip for detection of the a little salt radical permutation SNP of a gene and point mutation characterized by a current being able to be detected is offered.

[[0014]] With furthermore, sealed internal sky Mabe who presupposes that restoration and removal of Sample DNA are possible for this invention in order to solve the above-mentioned technical problem The golden electrode of a large number formed in the base of this space section, and the common electrode arranged so that the above-mentioned golden electrode may not be contacted in the above-mentioned space section, It is the detection equipment of the a little salt radical permutation SNP of a gene, and point mutation equipped with the measuring device which impresses an electrical potential difference to the above-mentioned common electrode and the above-mentioned golden inter-electrode one, and makes a current them detectable. To the above-mentioned golden electrode The detection equipment of the a little salt radical permutation SNP of a gene and point mutation characterized by being characterized by fixing the PCR product or oligonucleotide which consists of a different gene sequence is offered.

[[0015]] It is good also as a configuration which forms the above-mentioned building envelope, the above-mentioned golden electrode, and the above-mentioned common electrode so that

it may be contained in a detection chip, equips the above-mentioned detection measuring device with the above-mentioned detection chip free [attachment and detachment], and can connect it electrically.

[[0016]] The temperature of the above-mentioned detection chip is changed using a Peltier device, and it is good also as control of the temperature conditions of the above-mentioned hybridization being possible.

[[0017]] Furthermore, it is filled up with DNA by which gene amplification was carried out to space circles from Sample DNA or Sample DNA in order that this invention may solve the above-mentioned technical problem. Make vibes RIDAIZESHON perform, form a double strand chain, and it is filled up with the electrolyte which contains an electrochemistry activated molecule in the above-mentioned space circles after that. By controlling temperature, combining an electrochemistry activated molecule with the above-mentioned double strand, and detecting the current value which impresses an electrical potential difference to the above-mentioned common electrode and the above-mentioned golden inter-electrode one, and flows The detection approach of the a little salt radical permutation SNP of a gene and point mutation characterized by detecting the a little salt radical permutation SNP and point mutation of Sample DNA is offered.

[[0018]]

[[Embodiment of the Invention]] The gestalt of implementation of detection equipment and a detection chip is explained to the detection approach of the a little salt radical permutation SNP of the gene concerning this invention, and point mutation, and a list below with reference to a drawing based on an example. In drawing 1, the detection equipment 1 of the a little salt radical permutation SNP of a gene and point mutation concerning this invention inserts the detection chip 2 and this detection chip 2 for hybridization, and consists of measuring devices 3 whose analysis detect the double stranded DNA produced by hybridization, and is enabled.

[[0019]] In drawing 2, the detection chip 2 is formed as a chip of the shape of a card or a cassette of the ceramics, synthetic-resin material, etc., and consists of the body section 4 and up covering 5 (shown by the fictitious outline in drawing) with which this body section 4 is equipped from the upper part. This detection chip 2 is formed in an acid and alkali with the ingredient which has resistance, and the thing transparent so that it can observe from the outside to carry out of especially the up covering 5 is desirable.

[[0020]] the body section 4 -- the rectangular hollow 6 is mostly formed in the center. If the body section 4 is equipped with the up covering 5 and it is one by this, the part of the hollow will serve as the sealed space section 5. A golden spot is arranged on the base 7 of the space section 5, i.e., the base of a hollow 6, in the shape of a matrix, and is vapor-deposited on it, and the array-like golden electrode 9 which consists of many golden electrodes 8 is formed in it.

[[0021]] Although the enlarged drawing of the golden electrode 8 is shown in the right-hand side of drawing 2, on the golden electrode 8, the PCR product and SH-ized oligonucleotide 10 which thiol-ized to the five prime end of an oligonucleotide, and introduced the sulfhydryl group into it are being fixed as shown by this enlarged drawing. Although an PCR product is double stranded DNA, this oligonucleotide that thiol-izes the five prime end of one chain, and has introduced the sulfhydryl group has 20 - 50 base **** die length, and is being fixed on the golden electrode 8 through the thiol group introduced into that end face.

[[0022]] Many terminal terminals 12 are installed by the point 11 of the detection chip 2. The golden electrode 8 is combined with wiring 13, respectively, and the other end of this wiring is ****(ed) so that it may combine with each of the terminal terminal 12.

[[0023]] In addition, wiring to as opposed to [as shown in drawing 4 (a)] the golden electrode 9 the golden electrode 8, as shown in drawing 4 (b) although it is alike, respectively,

and it may correspond, one may connect at a time and you may connect with the terminal terminal 12, respectively It considers as the matrix wiring structure of connecting the golden electrode 9 arranged in the shape of an array to the lead wire of the length which approaches, respectively, and width as wiring of the shape of a grid which consists of much length used for the liquid crystal display etc., and the horizontal lead wire 14 and 15. In this case, the end of the lead wire of length and width will be connected to the terminal terminal 12.

[[0024]] In this example, the common electrode 16 which is a counter electrode is arranged in the location which does not touch the golden electrode 9 arranged in the shape of a matrix on the base of a hollow 6. Wiring of the common electrode 16 is formed of golden vacuum evaporation like a golden electrode. The common electrode 16 is ****(ed) so that it may connect with the terminal terminal 17 for common electrodes. Furthermore, the current value between each golden electrode 9 and the common electrode 16 which is a counter electrode is measured on the basis of the value of the reference electrode 28 wired in the form which touches the space in a hollow 6, and has the structure where an exact current value is acquired for every measurement.

[[0025]] The injected holes 18 and 19 (refer to the important section enlarged drawing shown above [in drawing 2].) of the right and left which are open for free passage to a hollow 6 are formed in the both-sides section of the body section 4 of the detection chip 2, and the up covering 5, it is usually closed by the cap plug, and a closed space S is formed. A cap is removed and the syringes 20 and 21 of DISUP0ZARU can be inserted in these injected holes 18 and 19. A solution can be poured in by this into the sealed space section S which is formed with a hollow 6 and the up covering 5, or exchange and mixing of the solution in the space section S can be performed quickly.

[[0026]] The measuring device 3 has the insertion opening 22

which inserts the detection chip 2. As drawing 4 (c) shows, it connects with the terminal terminal 17 for common electrodes, and each terminal terminal 12 for golden electrodes, and the circuit 23 which impresses an electrical potential difference between the terminal terminal 17 for common electrodes and each terminal terminal 12 for golden electrodes is arranged in the interior of the insertion opening 22. And when an electrical potential difference is impressed between the terminal terminal 17 for common electrodes, and each terminal terminal 12 for golden electrodes, it considers as the configuration so that the current which flows between the common electrode 16 and each golden electrode 8 can be detected and measured with the detector 24 in which it was prepared in the circuit 23.

【0027】 The measurement data based on this detected current is digitized in the A-D-converter 25 grade linked to a detector 24, and is used as processed data, such as analysis of a sample, and identification, with a personal computer 26. Furthermore, a measuring device 3 is equipped with the temperature control apparatus which consists of a Peltier device, and it is.

【0028】 The a little salt radical permutation SNP of a gene and the operation of the detection equipment 1 of point mutation concerning this invention which consists of the above configurations are explained. Up covering is combined by one and the detection chip 2 is sealed by the body section 4. And as shown in drawing 3, the solution which inserts syringes 20 and 21 in injected holes 18 and 19, and contains Sample DNA is poured in.

【0029】 In addition, Sample DNA uses the thing which decomposed DNA extracted from the living thing ingredient by DNase or sonication, or DNA which amplified by PCR (polymerase chain reaction method) from the specific gene. These samples DNA denaturalize by heat treatment just before hybridization.

【0030】 As for DNA and Sample DNA of the PCR product which has a complementary base sequence mutually, or an oligonucleotide, addition of Sample DNA (condition of a single strand) of DNA

(condition of a single strand) of the fixed PCR product or an oligonucleotide performs hybridization. Under the present circumstances, the insertion opening 22 in a measuring device 3 is inserted and equipped with the detection chip 2, and by the Peltier device equipped in the measuring device 3, temperature is controlled and it controls on the temperature conditions of hybridization.

[[0031]] After this hybridization is performed, the detection chip 2 is extracted from a measuring device 3, a penetrant remover is poured in with a syringe from one injected hole 18, from the injected hole 19 of another side, the liquid in the space section S is attracted, and the sample DNA which did not carry out hybridization is flushed and washed.

[[0032]] After performing such washing, the electrolytic solution containing an electrochemistry activated molecule is poured in into the space section S from injected holes 18 and 19 with a syringe. An electrochemistry activated molecule does so the function to change electrical characteristics, such as resistance of double stranded DNA, by hybridization. This point is explained to JP,9-288080,A at the detail.

[[0033]] If a measuring device 3 is again equipped with the detection chip 2 which performed such processing, the terminal 17 for common electrodes of the detection chip 2 and each terminal terminal 12 for golden electrodes are connected to a potential circuit 23 and a weak electrical potential difference is applied between the common electrode 16 and each golden electrode 8, to the golden electrode 8 connected with the double stranded DNA produced by hybridization, a feeble current will flow through a potential circuit 23 and the common electrode 16. Temperature is controlled by the Peltier device equipped in the measuring device 3, and the current value in different temperature is measured.

[[0034]] A current flows to the double stranded DNA after hybridization one by one by changing I as opposed to / as a measuring device 3 shows to drawing 4 (c) / the terminal 12 for each golden electrodes] the scan terminal 27 automatically,

it is detected, this detection result is changed into digital data by an A-D converter etc., and it is accumulated in memory etc. as measurement data with a personal computer.

Identification and analysis of Sample DNA are performed by this measurement data. For example, the analysis and identification of Sample DNA are attained by comparing with the DNA data of the various kinds accumulated beforehand etc.

[[0035]] Next, the example of an experiment of electrochemical detection equipments, such as base substitution of the gene concerning this invention and point mutation, is explained.

[[0036]] (Example 1 of an experiment) The example of an experiment of detection of the a little salt radical permutation SNP in the 72nd codon of a gene p53 is shown. It fixed by carrying out the spot of the oligonucleotide with the base sequence equivalent to two kinds of following poly mol FIZUMU (genetic polymorphism) to each golden electrode.

p53Pro (the 72nd codon is Pro)

p53Arg (the 72nd codon is Arg)

[[0037]] The after [thermal denaturation] hybridization reaction was performed for the PCR product which amplified the field containing DNA extracted to this from being [the 72nd codon of p53 / Pro] forward Tsuneto's peripheral blood, and the codon 72 which exists in the exon 4 of p53 from this DNA. The current value change before and behind the hybridization of 470 mV (Ag/AgCl reference electrode criteria) was measured at 20 degrees as a measurement electrolytic solution in 0.1 MAcOH-AcOK (pH5.6), 0.1M KCl, and 0.05mM NFe.

Current change of DNAp53Pro extracted from peripheral blood (%) Current change of 52%p53Arg (%) Current change of 15%PCR product p53Pro (%) Current change of 65%p53Arg (%) 13% [[0038]] Furthermore, the 72nd codon of p53 performed the hybridization reaction for the PCR product which amplified the field containing DNA extracted from the peripheral blood of forward Tsuneto who is Arg, and the codon 72 which exists in the exon 4 of p53 from this DNA similarly.

Current change of DNAp53Pro extracted from peripheral blood

(%) Current change of 46%p53Arg (%) Current change of 17%PCR product p53Pro (%) Current change of 53%p53Arg (%) 11% [0039] The case of the base sequence which these current change matched completely, and in the case of a mismatch, the clear difference was accepted.

[0040] (Example 2 of an experiment) The current values measured with the number of base exchange differ, and the example of an experiment which showed that the amount of a mismatch could be measured by this is explained. It fixed by carrying out the spot of seven sorts of oligonucleotides, dT20, dT10dAdT9, dT8dA4dT8, dAdT19, dA3dT17, dT19dA, and dT17dA3, to each golden electrode. The hybridization reaction was performed for dA20 to this.

[0041] The current value change before and behind hybridization was measured by 470mV (Ag/AgCl reference electrode criteria) at 20 degrees as a measurement electrolytic solution among 0.1 M AcOH-AcOK (pH5.6), 0.1M KCl, and 0.05mM NfC. This measurement result is shown in Table 1.

[0042]

[Table 1]

	dT20	dT10dAdT9	dT8dA4dT8	dAdT19	dA3dT17	dT19dA	dT17dA3
電流変化 (%)	37	22	15	14	14	20	12
T _m (度)	46	36	21	45	46	42	41

[0043] The current change in Table 1 was change for which it depended on the amount of a mismatch base mostly. When a mismatch existed especially in an end, a bigger change than T_m value was seen. At the conventional SSCP, although such a system was undetectable, it became clear for the first time by this technique.

[0044] As mentioned above, although the example explained detection equipment and a detection chip to the approach and list which detect the a little salt radical permutation SNP

and point mutation of the gene concerning this invention, it cannot be overemphasized that this invention is not limited to such an example and has the mode of various operations within the limits of the technical matter of a claim especially.

[[0045]]

[[Effect of the Invention]] Since detection equipment and detection chips are the above configurations, it becomes possible to detect that high sensitivity is also about a lot of a little salt radical permutation SNP and point mutation, and to analyze for two or more samples DNA, at the approach and list which detect the a little salt radical permutation SNP and point mutation of the gene concerning this invention.

[[0046]] thus, the detection equipment concerning this invention which can perform processing of high sensitivity and a high throughput (a high speed -- extensive) -- the gene in biology and the medicine field, and an expression -- it is a means effective in the analysis of correlation with a characteristic. detection / analysis equipment of the a little salt radical permutation SNP and point mutation applied to this invention in specific genes, such as a drug metabolizing enzyme and an antioncogene, -- it can use also for the field of gene diagnosis by analyzing.

[[0047]] For example, with the detection equipment concerning this invention, since processing of high sensitivity and a high throughput (high-speed mass) is possible, the Japanese a little salt radical permutation SNP and the data of point mutation can be collected, the a little salt radical permutation SNP and point mutation relevant to the sick onset can be identified, and it can use for prevention of adult diseases, such as cancer and hypertension, etc.

[[Translation done.]]